



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

超快速T4 DNA连接酶

货号: K23928

储存条件: 20° C储存;避免反复冻融

有效期: 24个月

产品简介:

本公司生产的超快速 T4 DNA 连接酶, 即 Instant T4 DNA Ligase, 是 T4 DNA 连接酶的升级版, 可以快速高效催化粘端或平端双链 DNA 或 RNA 的 5'-P 末端和 3'-OH 末端之间以磷酸二酯键结合, 该催化反应需 ATP 作为辅助因子。同时 Instant T4 DNA Ligase 可以修补双链 DNA、双链 RNA 或 DNA/RNA 杂合双链中的单链缺刻(single-strand nicks)。

来源(Source)	大肠杆菌重组表达, 表达基因的来源为 T4 嗜菌体。
外观(Appearance)	无菌液体
保存液(Storage Buffer)	20mM Tris, pH7.5, 50mM KCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA and 50% (v/v) glycerol。
酶浓度(Enzyme Concentration)	1000U/μl
活性定义(Activity Definition)	One unit is defined as the amount of enzyme required to give 50% ligation of HindIII fragments of λ DNA in 30min at 16 °C in 20μl of the assay mixture containing 50mM Tris, pH7.5, 10mM MgCl ₂ , 10mM DTT, 1mM ATP, 25μg/ml BSA and a 5'-DNA termini concentration of 0.12μM (300μg/ml)。200U 等于 1 个Weiss unit, 以 Weiss unit 计, 本产品的包装分别为 200U 和 1000U。

组分和说明

组分	K23928-40KU	K23928-200KU
Instant T4 DNA Ligase (1000U/μl)	40μl	200μl
10X Ligation Buffer	200μl	1ml
说明书	1 份	

产品应用



Instant T4 DNA Ligase 常用于 DNA 片段和载体、linker 或 adaptor 等的连接。也可用于缺刻修复及 Ligase 介导的 RNA 检测。产品优势修复及 Ligase 介导的 RNA 检测。

使用说明

1. PCR 产物或酶切片段和普通载体的连接。

a. 取 1-2 μ g 载体酶切过夜，或至少酶切 3-5h 以上。尽量确保酶切充分，否则后续会导致产生很多自连的克隆。

注：如果载体进行的是单酶切，请务必进行去磷酸化处理，推荐使用 Antarctic Phosphatase(Thermosensitive) 避免后续产生很多自连的克隆。

b. 载体酶切或去磷酸化处理完毕后，可以使用试剂盒进行纯化，例如磁珠法 PCR/DNA 纯化试剂盒或 PCR 纯化试剂盒/DNA 纯化试剂盒。也可以采用常规的酚氯仿抽提乙醇沉淀方法纯化载体。对于酶切产生较大片段(大于 50-60bp)的情况推荐采用切胶回收的方式。

c. 对于 PCR 产物：PCR 产物凝胶电泳后，切胶回收预期大小的 DNA 片段。凝胶中 DNA 片段的回收可以使用试剂盒进行操作，例如的磁珠法 DNA 凝胶回收试剂盒或 DNA 凝胶回收试剂盒。也可以采用反复冻融等方法回收 DNA 片段。

d. 对于回收的 PCR 产物或其它需酶切的 DNA 片段，用适当内切酶酶切，随后纯化酶切产物。

注：这一步的酶切不必酶切特别充分，通常酶切效率能达到 80-90% 以上即可。即本步骤的酶切通常酶切 1-2 小时即可。酶切产物可使用试剂盒进行纯化，也可以采用常规的酚氯仿抽提乙醇沉淀方法纯化。

e. 取约 25-100ng 经过酶切和纯化的载体，加入 3 倍摩尔数的待插入片段。参考下表设置连接反应体系。

注 1：很多时候由于载体量和待插入片段的量都比较少，在回收后很难定量。此时可以根据回收前电泳条带的亮度进行大致的估计。通常以 DNA 分子量标准的某一条带为参考，估计或通过灰度半定量目的条带和该参考条带的亮度的比例关



系。然后再按照预计的纯化或凝胶回收时的得率计算出最终得到的载体量和待插入片段量的比例关系。超纯水推荐使用Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)。

注 2: 通常每个反应使用 0.2-0.5 μ l 连接酶已经足够, 如果希望进一步提高连接效率, 可以把连接酶的用量提高至 1 μ l。

Reagent	Amount
Vector	50-100ng
Insert	3:1 (mole ratio) VS Vector
10X Ligation Buffer	2 μ l
Ultrapure Water	To 20 μ l
Instant T4 DNA Ligase	0.2-0.5 μ l
Total volume	~20 μ l

f.用移液器轻轻吹打混匀或轻微 Vortex 混匀, 室温离心数秒, 使液体积聚于管底。

g.16 $^{\circ}$ C 孵育 1-18h, 或 20-25 $^{\circ}$ C 孵育连接 1-2h。

注 1: 同时兼容双平端和双粘端 DNA 片段连接。

注 2: 通常 16 $^{\circ}$ C 孵育 1-4h 即可以获得较好的连接效果。

h.随后即可直接取连接产物用于转化感受态细菌。

2.PCR 产物和 T 载体的连接。

a.PCR 产物凝胶电泳后, 切胶回收预期大小的 DNA 片段。凝胶中 DNA 片段的回收可以使用例如磁珠法 DNA 凝胶回收试剂盒或 DNA 凝胶回收试剂盒等试剂盒, 也可以采用反复冻融等方法回收 DNA 片段。

b.按照 T 载体的说明书取适量 T 载体, 加入 3 倍摩尔数的待插入片段。参考下表设置连接反应体系。

注 1: 很多时候由于载体量和 PCR 产物的量都比较少, 在回收后很难定量。此时可以根据回收前电泳条带的亮度进行大致的估计。通常以 DNA 分子量标准的某一条带为参考, 估计或通过灰度半定量目的条带和该参考条带的亮度的比例关系。然后再按照预计的纯化或凝胶回收时的得率计算出最终得到的载体量和 PCR 产物的量的比例关系。



注 2: 通常每个反应使用 0.2-0.5 μ l 连接酶已经足够, 如果希望进一步提高连接效率, 可以把连接酶的用量提高至 1 μ l。

Reagent	Amount
T vector	As recommended
Insert	3:1 (mole ratio) VS Vector
10X Ligation Buffer	2 μ l
Ultrapure Water	To 20 μ l
Instant T4 DNA Ligase	0.2-0.5 μ l
Total volume	~20 μ l

c.用移液器轻轻吹打混匀或轻微 Vortex 混匀, 室温离心数秒, 使液体积聚于管底。

d.16 $^{\circ}$ C 孵育 1-18h, 或 20-25 $^{\circ}$ C 孵育连接 1-2h。

注: 通常 16 $^{\circ}$ C 孵育 1-4h 即可以获得较好的连接效果。

e.随后即可直接取连接产物用于转化感受态细菌。

3.Linker 或 miRNA/RNAi/ sgRNA 等小 RNA 表达用 DNA 片段和载体的连接:

a.载体的酶切和纯化同步骤 1a 和 1b。

b.Linker 或 miRNA、RNAi、sgRNA 等小 RNA 表达用 DNA 片段的退火可以选择适当的DNA 退火缓冲液, 进行退火反应。

c.长度大于 8bp 的 Linker 或退火的小 RNA 表达用 DNA 片段, 可以按照 5:1 至 10:1 的比例和载体进行连接反应。例如载体为 0.03 μ mol, 则插入片段可以为 0.15 至 0.3 μ mol。长度小于 8bp 的 linker, 比例需调整为 10:1 以上。

d.除插入片段的用量外, 随后按照步骤 1e-1h 进行。

4.DNA 自身环化的连接:

参考步骤 1e, 待插入片段换成适量的水即可。其余步骤按照步骤 1f-1h 进行。

5. 其它类型的 DNA 片段连接参考上述方法进行。

常见问题

1.连接反应后转化效率很低或阳性克隆非常少。



a.可能感受态细菌转化效率太低，用质粒作为阳性对照同时检测感受态的转化效率。

b.可以尝试提高载体或插入片段的纯度，也可以考虑适当提高载体或插入片段的用量。对于平端连接需注意适当延长连接时间。

c.可能载体酶切不够充分，用未经连接的载体转化作为阴性对照。d.用存放DNA的溶液进行转化，作为阴性对照，检测感受态细菌是否存在问题。

注意事项

(1)对于普通的转化大肠杆菌的操作，不必对连接产物进行纯化，连接产物可以直接用于转化。但用电转方法转化大肠杆菌时，通常宜先用DNA纯化试剂盒或酚氯仿抽提方法等纯化DNA，然后再进行电转。

(2)需进行平端连接或快速连接时，推荐使用快速DNA连接试剂盒。Instant T4 DNA Ligase可以进行平端连接，但效率较低。

(3)普通连接反应不必进行凝胶电泳观察。如果需要对于连接产物进行凝胶电泳观察，推荐先在65℃孵育10分钟使Instant T4 DNA Ligase失活，以避免Instant T4 DNA Ligase和DNA结合导致的条带位置迁移(band shift)。

(4)本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。

(5)为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。